云 南 植 物 研 究 1987; 9 (4): 495—502
Acta Botanica Yunnanica

重楼属植物甾体皂甙的高效液相色谱分析

陈昌祥 丁靖凯 阮德婍 李 恒 周 俊

(中国科学院昆明植物研究所，昆明)

摘要 应用高效液相层析技术，对重楼属十八个种植物的甾体皂甙进行了定性、定量分析。植物用甲醇提取，抽出物经DIAION柱，以90%甲醇洗出总甙。在HPLC上，用ODS柱先将总甙以甲醇：水（9：1）洗脱分为三馏段，每馏再在ODS柱或Rp-8柱上以甲醇：水（8：2；7：3.5）洗脱，使各个皂甙成分完全分离。被分离的每个色谱峰与已知重楼皂甙的保留时间进行比较并配合HPLC的加入法，TLC分析及用HPLC制备少量样品做MS测定来加以定性鉴定。定量采用内标及校正曲线法。

关键词 甾体皂甙；重楼属植物；定性和定量分析；高效液相色谱

在天然产物中，甾体皂甙类化合物的分离难度较大，因而对植物中各个甾体皂甙如何进行定量测定是一个引人注目的课题，但迄今为止未见这方面的报道。本文应用高效液相色谱技术，进行了重楼甾体皂甙定性、定量方法的研究，并对重楼属十八个种植物的甾体皂甙作了定性和定量分析。

我们曾对六种重楼植物中的甾体皂甙用化学方法进行了分离鉴定[1－4]。共鉴定了十六个皂甙成分，它们是由薯芋皂甙元（diosgenin），偏诺皂甙元（pennogenin）和24α-羟基偏诺皂甙元（24α-hydroxy pennogenin）分别与糖以不同形式连接而成（图1）。如我们的报告所表明，这些甾体皂甙在分离上难度较大。因此，在HPLC上希望

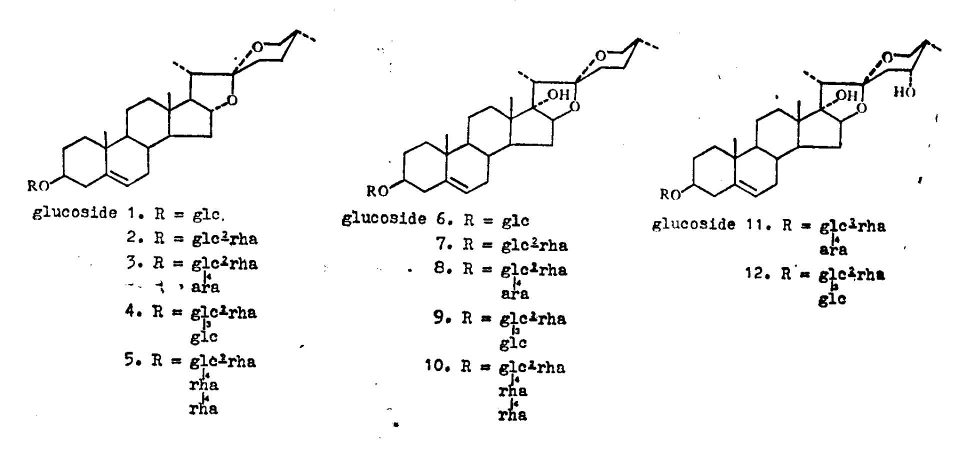


图1 重楼属植物甾体皂甙的结构

Fig. 1 The structures of steroidal saponins of *Paris*

1986-07-21收稿

表1 重楼属植物中甾体皂甙化合物的含量（以干样计%）

Table 1 Content of Steroidal Saponins of *Paris* (% in dry sample)

	Plant name	Part of plant	Diosgenin group			
			1	2	3	4
海南重楼	P. dunniana	rhizome			tr.	
凌云重楼	P. cronquistii	rhizome		0.81	0.67	
南重楼	P. vietnamensis	rhizome	tr.		0.15	1.07
金线重楼	P. delavyi	whole plant	tr.	tr.	tr.	
滇重楼	P. polyphylla var. yunnanensis	rhizome		0.05	1.16	0.21
七叶一枝花	P. polyphylla var. chinensis	rhizome		0.01	0.02	
狭叶重楼	P. polyphylla var. stenophylla	whole plant	0.01		0.01	
长药隔重楼	P. polyphylla var. pseudothibetica	whole plant	0.01	0.08	0.01	
大萼重楼	P. polyphylla var. macrosepala	rhizome		0.01	0.01	0.04
毛重楼	P. mairei	rhizome			0.01	
花叶重楼	P. marmorata	whole plant	0.01			
禄劝花叶重楼	P. luquanensis	rhizome				
球药隔重楼	P. fargesii	rhizome				
黑籽重楼	P. thibetica	rhizome	tr.	0.34	0.1	
五指莲重楼	P. axialis	rhizome		0.02	0.05	0.2
长柱重楼	P. forrestii			0.1	0.43	
日本重楼	P. japonica	rhizome			0.03	
巴山重楼	P. bashanensis	whole plant	0.01			

unk. comp. = unkown compound

找到一固定条件，使重楼植物所含的皂甙都得到完全分离较难实现。经过反复实验，我们先将重楼植物中的甲醇总抽出物通过DIAION柱，分得总甙，再在HPLC上，用ODS柱把总甙分离并定量制备为三馏段：即薯芋皂甙元组皂甙（A组）、偏诺皂甙元组皂甙（B组）和24α-羟基偏诺皂甙元组皂甙（C组，此组还含有开环甙）。再将此三组皂甙分别在R_p-8柱或ODS柱上用不同比例的甲醇:水洗脱，使每个皂甙都得到分离。

对于被分离的各个皂甙成分的定性，主要通过分离样品色谱峰与已知皂甙色谱峰的保留时间及相对保留时间的比较并配合加入法来识别。为了进一步确识，我们又将A、B、C三组皂甙与对应的已知皂甙用硅胶G及R_p-8薄层板进行薄层检查；另外在样品进行HPLC分析过程中，我们也收集一定量纯甾体皂甙，将其乙酰化后作质谱测定。所有数据均支持HPLC的定性结果。

定量分析采用加入内标及制作校正曲线的方法进行[5]，这既可避免分析时进样体积不能精确控制的毛病，也可除去分析样品中含有不能被洗脱的杂质的影响。为了验证

	unk.	pennogenin group					unk.	24α-OH-pennogenin group		unk.
5	comp.	6	7	8	9	10	comp.	11	12	comp.
tr.		0.02		0.09		0.11	2	0.08	0.1	
0.04		0.02	0.01	0.03		0.01	1			2
0.02				0.01		0.01				1
tr.			0.01	0.01		0.01	1	0.02	0.02	
0.58				0.04		0.05				1
0.02				2.6		1.4				
0.01			tr.	0.07	0.06	0.08				
0.01	1		0.02	0.04		0.02		0.86	tr.	
			0.01	0.4		0.4		0.01	0.01	1
0.01				0.01		0.01				1
0.04	1		tr.	0.04		0.02				
				0.23		0.03		0.03		1
			0.06	0.24		0.05	1			
			0.42	0.36		0.02		tr.		
	1		0.03		1.08	0.03		0.06	0.92	1
0.01		0.01								
0.01				0.01		0.01				
0.12						0.17				

tr. = trace

定量分析的准确性，我们把已知皂甙的纯品配成一定浓度的标样，在相同条件下进行定量测定，结果表明实验误差在±5％以内（表2）。

利用上述条件，我们对重楼属十八种植物的甾体皂甙进行了定性和定量分析，结果见表1。从分析数据可知：重楼属植物主要含有薯芋皂甙元、偏诺皂甙元和24α-羟基偏诺皂甙元的配糖体，以前二类甙元的配糖体含量较高，这与化学工作的结果相吻合。分析中，发现了几个为我们化学工作中尚未得到的皂甙，因而未能定性，定量。其中广西凌云重楼*P. cronquistii*有两个甙，已制备了纯样，结构鉴定工作正在进行。

通过对重楼属植物甾体皂甙的HPLC分析，我们认为，对含有较复杂化学成分的植物样品的HPLC分析，先分成几个馏段，再逐段进行定性分析，定量测定，仍不失为一个耗样品量少（此次分析，球药隔重楼只用了三克植物样品）、分析周期短，结果较为满意的方法。

表2 配制B组皂甙实际浓度与HPLC分析值的比较

Table 2 The comparison of the actual value abd HPLC analytical value of compounding saponins of B fraction

	化合物	实际值(mg/10ml)	HPLC测定值(mg/10ml)
6	P.—glc.	1.67	1.60
7	P.—glc. $\xrightarrow{2}$ rha.	11.66	1.65
8	P.—glc. $\xrightarrow{2}$ rha. | 4 ara.	1.75	1.68
9	P.—glc. $\xrightarrow{2}$ rha. | 3 glc.	1.68	1.60
10	P.—glc. $\xrightarrow{2}$ rha. | 4 rha. $\xrightarrow{4}$ rha.	1.69	1.82

实验部分

仪器 岛津LC-4A 高效液相色谱仪，C-R_3A数据处理机，RID-2AS检测器。层析柱：Zorbax ODS 250×4.6mm (Dupont)，Zorbax C_8 250×4.6mm (Dupont)，Partisil ODS 250×9.4 mm (Whatman) 流动相：① MeOH-H_2O (9:1)；② MeOH-H_2O (8:2)、③ MeOH-H_2O (7.5:2.5)；④ MeOH-H_2O (7:3.5)。

1.总甙 每种重楼各取3—10克干粉，用甲醇室温浸泡四次，每次30ml甲醇，浸泡三天。合并甲醇液，减压蒸至糖浆状，加入50ml蒸馏水溶解，通过DIAION HP-20 (Mitsubishi Chem Ind, Tokyo, Japan) 柱，用400ml蒸馏水洗脱除去糖，再用500ml 90% MeOH-H_2O洗脱，将此部分减压蒸干得粉状总甙，作为被测样品。

2.总甙的分段制备 称取约400mg粗甙，用洗脱液溶于10ml容量瓶中，在Zorbax ODS柱上，用溶剂①洗脱，流速0.3ml/min，进样量100μl，分成A、B、C三段定量收集（图2）。共制备10次。各段蒸干作为定性、定量测定样品。

3.校正曲线的制作 参照文献[5]方法分别称取薯芋皂甙元组五个已知皂甙样品各5—10mg，用甲醇溶于10ml容量瓶中，加入内标溶液1ml (pennogenin, 1mg/ml, $CHCl_3$)，用洗脱液稀释至刻度，在Zorbax ODS柱上进行层析。洗脱液：溶剂②，流速：0.3ml/min，进样量20μl。以三次分析平均值的样品色谱峰面积与内标色谱峰面积之比为纵坐标，每10ml分析液中所含样品的毫克数为横坐标，画出该化合物的校正曲线。

用同样方法制作偏诺皂甙元组皂甙和24α-羟基偏诺皂甙元组皂甙的校正曲线。层析条件：偏诺皂甙元皂甙组，色谱柱：Zorbax C_8，洗脱液：溶剂③，流速0.25ml/

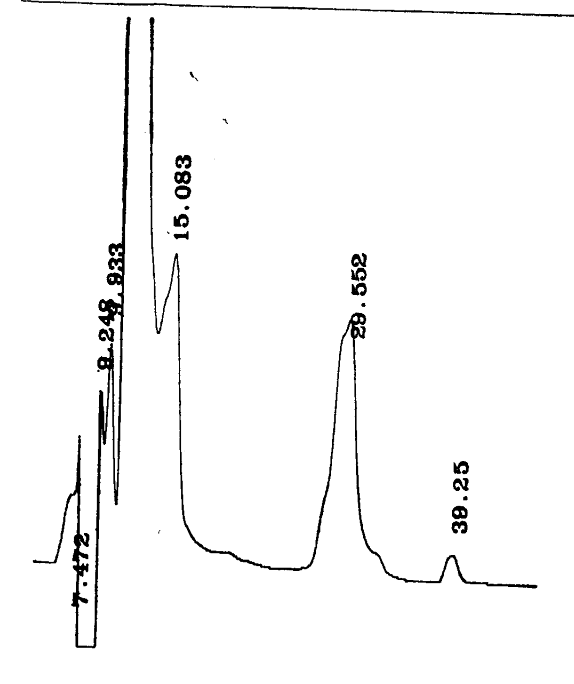


图 2　滇重楼A、B和C三馏段的HPLC色谱图

Fig. 2　HPLC of A, B and C fractions of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*. Column: Zorbax ODS 250×4.6mm (dupont). Detector:RID-2As. Mobile phase:MeOH:H_2O (8:1). Flow rate:0.3 ml/min.

min，内标化合物：甙5；24α-羟基偏诺皂甙元组皂甙，色谱柱：Zorbax ODS，洗脱液：溶剂④，流速：0.25ml/min，内标化合物：人参皂甙 R (Ginsenoside R)

4.各组皂甙的定性和定量测定　将总甙定量制备得A组皂甙（薯芋皂甙元组皂甙）全部置于1ml容量瓶中，加入A组的内标溶液0.1ml，用洗脱液稀释至刻度。以制作A组化合物校正曲线完全相同的条件进行HPLC分析。根据与已知皂甙保留时间的比较（图3、4）定性，再由定性了的某个皂甙色谱峰面积与内标峰面积之比，从该皂甙校

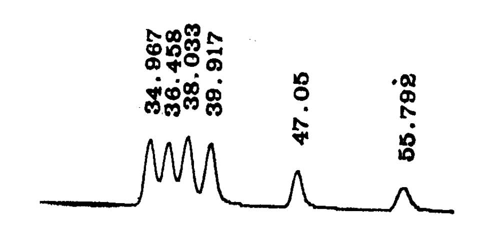


图 3　A组已知皂甙的HPLC色谱图

Fig. 3 HPLC of standard compounds of A fraction. Column:Zorbax ODS 250×4.6 mm (dupont). Detector:RID-2 AS. Mobile phase:MeOH:H_2O (8:2). Flow rate:0.3 ml/min.

D.—glc.$\overset{2}{—}$rha. │4 rha.$\underset{4}{—}$rha.	34.9 min	D.—glc.$\overset{2}{—}$rha. │4 ara.	36.4min
D.—glc.$\overset{2}{—}$rha. │3 glc.	38.0min	D.—glc.$\overset{2}{—}$rha.	39.9min
Internal standard	47.0 min	D.—glc.	55.8 min

正曲线上求出其浓度，三次分析的平均值为定量结果。

B组和C组皂甙的定性、定量同A组。

5.未知皂甙的制备　在HPLC分析中，与已知皂甙比较，对尚不能认识的甙就单独制备纯品。广西凌云重楼，在A组部分有两个皂甙不能定性（图5）。用Partisil ODS柱，洗脱剂：2洗脱，流速0.35ml/min，分离到这两个甙的纯品。

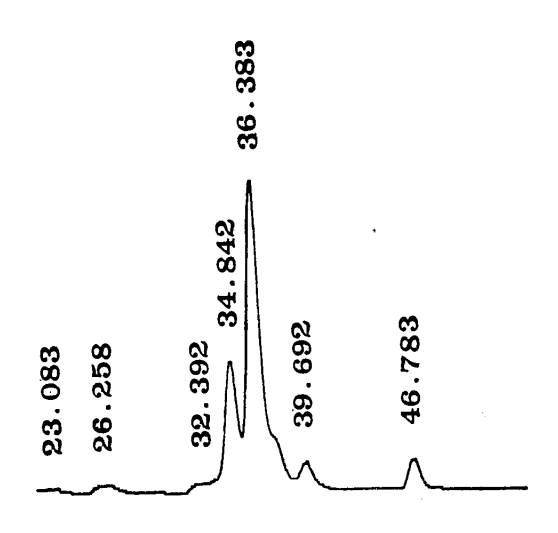


图4　滇重楼A馏段的HPLC色谱图

Fig. 4 HPLC of A fraction of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*.
Column: Zorbax ODS 250×4.6 mm (dupont). Decector: RID-2AS.
Mobile phase: MeOH:H_2O (8:2). Flow rate: 0.3 ml/min.

D.—glc. $\xrightarrow{2}$ rha. (|4 rha. $\xrightarrow{4}$ rha.)　34.8min

D.—glc. $\xrightarrow{2}$ rha (|4 ara)　36.4min

D.—glc. $\xrightarrow{2}$ rha.　39.7 min

Internal standard　46.8 min

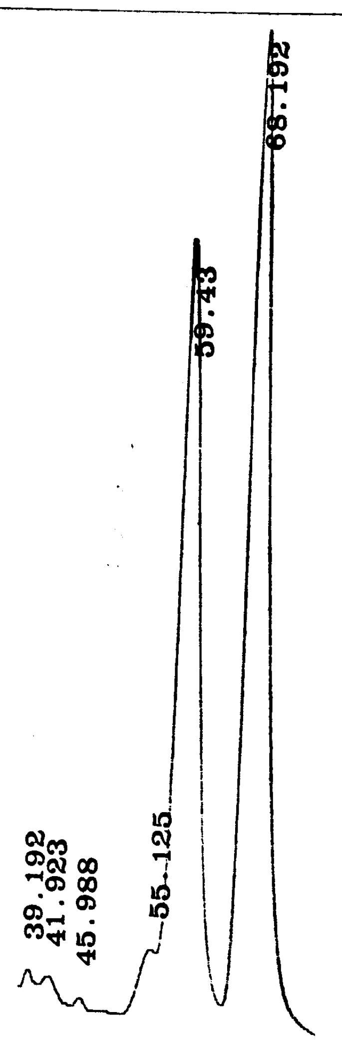


图 5　凌云重楼未知皂甙的HPLC色谱图

Fig. 5 The saponins of *P. cronquistii* were prepared by HPLC.

Column: Zorbax ODS 250×4.6 mm (dupont). Detector: RID-2AS.

Mobile phase: MeOH:H_2O (9:1). Flow rate: 0.5 ml/min.

致谢　杨崇仁同志提供人参皂甙 R 标准化合物。

参 考 文 献

1　陈昌祥，周俊．云南植物研究　1981；3：89—93

2　陈昌祥，周俊．云南植物研究　1983；5：91—97

3　陈昌祥，周俊．云南植物研究　1983；5：219—223

4　陈昌祥，周俊．云南植物研究　1984；6：111—117

5　Kimata H, Hiyama C, Yahara S. et al. *Chem Pharm Bull* 1979; 27(8): 1836—1841

THE DETERMINATION OF THE STEROIDAL SAPONIN FROM PARIS PLANTS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Chen Changxiang, Ding Jingkai, Ruan Dechun, Li Hen, Zhou Jun

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming)

Abstract The steroidal saponin of 18 species of *Paris* were qualitatively and quantitatively analysed by means of HPLC.

Methanolic extracts obtained from the dried roots of *Paris* plants were combined and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in H_2O and then the solution chromatographed on a DIAION HP-20 column eluting with H_2O and 90% MeOH successively. The 90% MeOH fraction was concentrated in vacuo to give a residue crude saponins. This residue was chromatographed on a ODS column with MeOH-H_2O (9 : 1) to divide into three fractions. The each fraction was further separated and purified by ODS or R_p-8 column chlumatography using MeOH-H_2O with increasing H_2O content as eluent to give complefely separated each chemical constituents. The identification of the each chromatographic peak separation on HPLC was compared with retention time and TLC as well as MS detection of pure compound separated from HPLC. The internal standard and calibration curve method were used for the quantitative analysis.

Key words steroidal saponins; *Paris*; Quanlitative and quantitative analysis; High Performance Liquid Chromatography